

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 330 820**

21 Número de solicitud: 200703105

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **23.11.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2009**

Fecha de la concesión: **13.10.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **26.10.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2010**

73 Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid  
Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Blanco Suárez, Ángeles;  
Torres García, Claudia Esperanza;  
Negro Álvarez, Carlos;  
Nande Barbeitos, María del Mar;  
Gibello Prieto, Alicia y  
Martín Fernández, Margarita**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Métodos y compuestos para la caracterización de la población bacteriana en biopelículas.**

57 Resumen:

Métodos y compuestos para la caracterización de la población bacteriana en biopelículas.

La invención se relaciona con sondas capaces de detectar específicamente de microorganismos de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* y de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*. Estas sondas pueden ser usadas para la detección de dichos microorganismos en muestras biológicas así como en biopelículas que aparecen en la maquinaria usada en la industria papelera. Adicionalmente, las sondas son útiles para la identificación de compuestos útiles en la eliminación de biopelículas.

ES 2 330 820 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Métodos y compuestos para la caracterización de la población bacteriana en biopelículas.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se relaciona con reactivos adecuados para la detección específica de microorganismos del género que forma parte habitualmente de las biopelículas que aparecen en la maquinaria usada en la industria papelera, particularmente *Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter* y *Pantoea*.

10 **Antecedentes de la invención**

Uno de los principales problemas asociados al proceso de fabricación de papel y cartón en la industria papelera es la formación de biopelículas o depósitos de slime o biopelícula que afectan tanto al proceso de fabricación del papel como a la calidad del producto final. Las biopelículas se definen como acumulaciones microbianas inmovilizadas y embebidas en una matriz de un polímero orgánico de origen microbiano (exopolisacáridos), mezclados con fibras, cargas minerales y otros componentes orgánicos e inorgánicos resultantes del metabolismo microbiano. Este problema es más acusado en la actualidad debido a la baja calidad de las fibras recicladas usadas hoy en día como materia prima así como a ciertos procedimientos que se usan actualmente (circuitos cerrados de agua, temperaturas de hasta 50°C y pH neutro), puesto que proporcionan un microentorno favorable para el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos.

La formación de biopelículas resulta en la aparición de defectos en el producto final tales como manchas y agujeros, malos olores y la pérdida de las propiedades ópticas del papel, así como una menor productividad en el proceso de fabricación debido a roturas y tiempos de limpieza y un mayor coste debido a los compuestos químicos usados para el tratamiento de las biopelículas.

Tradicionalmente, las biopelículas se han tratado usando agentes antimicrobianos de amplio espectro. Sin embargo, debido a los problemas medioambientales asociados a dichos tratamientos, es preferible usar tratamientos más específicos que no afectan a todos los microorganismos de forma indiscriminada sino sólo a aquellos que aparecen en las papeleras y que influyen negativamente en la calidad y en el rendimiento del proceso de fabricación de papel. Además, los microorganismos que forman las biopelículas son más resistentes a agentes biocidas que los microorganismos que no forman parte de dichas biopelículas por lo que el tratamiento indiscriminado con agentes biocidas poco específicos puede resultar en una selección de los microorganismos que forman la biopelícula. Uno de los grupos de microorganismos más abundantes en las papeleras son las enterobacterias y, más particularmente, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter* sp., *Raoultella* y *Klebsiella* sp. (Rättö, M. *et al.*, 2001, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57:182-185; Rättö, M. *et al.*, 2006, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33:359-367 y Väisänen, O.M. *et al.*, 1998, J. Appl. Microbiol., 84:1069-1084).

Sin embargo, la composición bacteriana exacta de las biopelículas depende tanto de la naturaleza de la contaminación bacteriana original como de las condiciones de crecimiento, por lo que la eficacia de un tratamiento puede variar enormemente entre distintas papeleras. Por tanto, la elección del tratamiento adecuado requiere el conocimiento previo de la composición microbacteriana de la biopelícula presente en la papelera.

WO2005045132 describe un método para la detección de microorganismos formadores de biopelículas en un proceso de fabricación de papel o cartón en el que se usan colorantes que identifican la totalidad de la biomasa, colorantes que muestran el número total de células, colorantes de viabilidad que muestran el número de células vivas y sustratos fluorogénicos que permiten detectar la presencia de determinadas actividades enzimáticas. Este método, sin embargo, únicamente proporciona información sobre la presencia de microorganismos en una determinada muestra sin aportar ninguna información sobre la identidad de los microorganismos detectados y, además, requiere el cultivo de los microorganismos antes de poder efectuar la determinación.

EP1350431 describe un método para la identificación de agentes antimicrobianos capaces de inhibir la formación de una biopelícula que incluye, en una primera etapa, la identificación de los microorganismos presentes en una biopelícula mediante la amplificación del ADNr 16S, su secuenciación y la posterior comparación con las secuencias de ADNr 16S disponibles en las bases de datos. Este método sólo permite identificar aquellos microorganismos cuyo ADNr 16S haya sido descrito con anterioridad y, además, no proporciona ninguna información sobre la viabilidad de dichos microorganismos.

Rättö, M. *et al.* (J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2005, 32:109-114) han descrito un método para la identificación de los microorganismos que forman parte de los depósitos de biopelículas que se forman en la maquinaria empleada para la fabricación de papel mediante secuenciación del ADNr 16S, ribotipaje, ensayos fisiológicos y análisis de ácidos grasos. Sin embargo, este método requiere múltiples ensayos para la caracterización de los microorganismos presentes, no proporciona ninguna información particular sobre qué microorganismos se encuentran formando parte de biopelículas y tampoco proporciona ninguna información sobre la viabilidad de los microorganismos.

Por tanto, es necesario un método que permita la detección de bacterias en su entorno natural, sin necesidad de cultivarlas, a la vez que la identificación de los microorganismos presentes en la muestra. Un método que proporciona una solución a dichos problemas es la hibridación *in situ* con marcadores fluorescentes (FISH) (Amman, R.I. *et al.*, 1995,

Microbiol. Rev., 59:143-149). Sin embargo, esta tecnología se ha utilizado sólo en contadas ocasiones para el estudio de la composición bacteriana de las biopelículas formadas en máquinas de fabricación de papel. Por ejemplo, la tesis doctoral de Kolari, M. ("Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces", mayo de 2003, Universidad de Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Applied Chemistry and Microbiology, disponible online en <https://oa.doria.fi/handle/10024/3281>) describe el uso de FISH para la identificación de *D. geothermalis* en biopelículas formadas en máquinas usadas en la fabricación de papel mediante el uso de sondas específicas para el ARN 16S de dicho organismo. Kim, S.B. *et al.* (Water Sci. Technol., 2002, 559-564) describen el uso de FISH para la identificación de *Thiothrix* sp., en aguas residuales procedentes de industrias papeleras o de tratamiento de aguas, mediante el uso de sondas dirigidas al ADNr 16S.

Sin embargo, ninguno de los métodos descritos hasta la fecha para identificar microorganismos en biopelículas permite la detección simultánea de microorganismos pertenecientes a más de un género. Además, la técnica de FISH presenta las desventajas de que (i) no proporciona ninguna información sobre la viabilidad de los microorganismos analizados y (ii) la sensibilidad viene determinada por el número de copias del ADN diana presentes en la muestra. Por ello, se han desarrollado métodos en los que la técnica de FISH se usa en combinación con otros métodos que si proporcionan información sobre la viabilidad de los microorganismos y que permiten aumentar la sensibilidad de la detección, tales como el recuento de células viables (Armisen, T. *et al.*, 2004, Water Science and Technology, 50:271-275; García-Armisen, T. y Servais, P., 2004, Journal of Microbiological Methods, 58:269-279), la citometría de flujo (Rigottier-Gois, L. *et al.*, 2003, FEMS Microbiology Ecology, 43:237-245), la reacción en cadena de la polimerasa *in situ* o la tinción con compuestos que sólo son capaces de detectar células vivas, tales como el yoduro de propidio.

Por tanto, es necesario el disponer de técnicas que permitan la caracterización de la población microbiana que forma las biopelículas que no presenten los inconvenientes de los métodos conocidos en el estado de la técnica, es decir, que permitan la caracterización de las especies o géneros de microorganismos presentes en la biopelícula y que, además, proporcionen información sobre su viabilidad.

La identificación de especies presentes en una población bacteriana es posible mediante el empleo de las llamadas sondas de especie, género y familia, que permiten detectar, respectivamente, todos los microorganismos de una determinada especie, de un determinado género o de una determinada familia. En el caso particular de las biopelículas que aparecen en las máquinas de fabricación de papel, las bacterias más abundantes son las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Hasta la fecha se han descrito sondas específicas para la familia de las enterobacteriaceas basadas en las secuencia de los nucleótidos 1251-1274 del ARNr 16S de *E. coli* (Ootsubo, M. *et al.*, 2002, J. Applied Microbiol., 93:60-68), la secuencia consistente en los nucleótidos 1273-1289 del ARNr 16S de *E. coli* (Loge, F. *et al.*, 1999, Water Environment Research, 71:75-83) o la denominada secuencia repetitiva intergénica (ERIC) (Hulton, C.S.J., *et al.*, 1991, Mol. Microbiol., 5:825-834). La sonda dirigida contra los nucleótidos 1251-1274 del ARNr 16S de *E. coli* (sonda D) ha sido usada para la detección específica de enterobacterias mediante FISH (Ootsubo, M. *et al.*, 2003, Journal of Applied Microbiology, 95:1182-1190).

Sin embargo, éstas son incapaces de distinguir los distintos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Por otro lado, JP7067657 y JP7067656 describen, respectivamente, sondas específicas para los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*. Sin embargo, estas sondas no han sido utilizadas hasta la fecha para el análisis de biopelículas y únicamente permiten la detección de microorganismos pertenecientes a un único género, lo que limita su aplicación para la caracterización de poblaciones bacterianas mediante FISH puesto que requeriría el uso de un marcador fluorescente por cada género presente en la población, lo que reduce necesariamente el número de cepas que pueden ser detectadas dado el limitado número de marcadores fluorescentes que pueden ser detectados simultáneamente. Por tanto, existe la necesidad en la técnica de métodos adicionales que permitan la caracterización en mayor detalle de los microorganismos que se encuentran formando parte de una biopelícula.

### Compendio de la invención

La invención se relaciona con un oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, con un oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* y con una sonda que comprende un oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de organismos de la familia *Enterobacteriaceae* acoplado a un resto fluorescente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de al menos un oligonucleótido de la invención o de una sonda según la invención para la detección de enterobacterias.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, que comprende

- (a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, en condiciones adecuadas para la hibridación de las sondas con los microorganismos pertenecientes a dichos géneros y
- (b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra.

## ES 2 330 820 B1

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de enterobacterias pertenecientes al género *Raoultella* en una muestra que comprende

(a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* y con una sonda específica para los microorganismos del género *Klebsiella*, en condiciones adecuadas para la hibridación de las sondas con los microorganismos pertenecientes a dichos géneros y

(b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótidos que han hibridado con la muestra

en donde las enterobacterias del género *Raoultella* son aquellas marcadas con la sonda específica de las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* pero no con la sonda específica del género *Klebsiella*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección en una muestra de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* que comprende

(a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida específicamente las de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* en condiciones adecuadas para la hibridación de las sondas con los microorganismos pertenecientes a dichos géneros.

(b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra

en donde los microorganismos pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* son aquellos marcados simultáneamente con la sonda específica de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de enterobacterias en una muestra de bacterias pertenecientes a la especie *Enterobacter aerogenes* Bac que comprende

(a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida de forma específica con especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* y con al menos una sonda que hibrida de forma específica con especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* en condiciones adecuadas para la hibridación de dichas sondas con el material genético perteneciente a los microorganismos de dichos géneros y

(b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra en donde los microorganismos pertenecientes a la especie *Enterobacter aerogenes* Bac son aquellos marcados simultáneamente con al menos una sonda que hibrida de forma específica con especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* y con al menos una sonda que hibrida de forma específica con especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la caracterización de una población bacteriana que comprende

(a) poner en contacto dicha población bacteriana con un oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* y

(b) determinar el número de células cuyo ADN hibrida específicamente con dicho oligonucleótido y el número total de células

en donde el porcentaje de células positivas cuyo ADN hibrida con el oligonucleótido con respecto al número de células totales indica el porcentaje de bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* en la muestra.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la caracterización de una población bacteriana que comprende

(a) poner en contacto dicha población bacteriana con un oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* y

(b) determinar el número de células cuyo ADN hibrida específicamente con dicho oligonucleótido sonda y el número total de células

en donde el porcentaje de células positivas cuyo ADN hibrida con el oligonucleótido con respecto al número de células totales indica el porcentaje de bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* en la muestra.

## ES 2 330 820 B1

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar la eficacia de un tratamiento antibacteriano sobre las enterobacterias que forman una biopelícula que comprende las etapas de

- 5 (a) someter la biopelícula a un tratamiento antibacteriano
- (b) poner en contacto dicha biopelícula con al menos una sonda que comprende un oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de organismos de la familia *Enterobacteriaceae* acoplado a un resto fluorescente y
- 10 (c) determinar el porcentaje de células positivas para la sonda o sondas aplicada o aplicadas en la etapa (b) con respecto al número total de células

15 en donde una reducción del valor determinado en la etapa (c) con respecto al valor determinado en ausencia de tratamiento antibacteriano es indicativo de que el tratamiento es particularmente eficaz para eliminar las enterobacterias de la biopelícula.

### Breve descripción de las figuras

20 Figura 1: Imagen compuesta de una doble hibridación de un cultivo puro de una muestra de biopelícula. Detección de bacterias positivas a la sonda ERIC marcada con FITC (panel inferior), EUB 338 marcado con CY3 (panel intermedio) y ADN teñido con DAPI (panel superior).

25 Figura 2: Efecto de tres tipos de productos antimicrobiológicos en el crecimiento de cepas enterobacterianas formadoras de biopelículas: (A) *E. aerogenes* Bac, (B) *E. cloacae* E-022114 y (C) *K. pneumoniae* E-011927. B1: Butrol, B2: Butrol 881, B3: Butrol 1072, B4: Butrol 1009, B5: Busperse 235, B6: Buzyme 2501.

### Descripción detallada de la invención

30 Los autores de la presente invención han identificado una secuencia en el ADNr 16S de *Klebsiella pneumoniae* y de *Raoutella planticola* que es específica de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella*, de forma que oligonucleótidos que contienen dicha secuencia pueden ser usados como sondas de género para la identificación de microorganismos pertenecientes a especies de dichos géneros. Así mismo, los autores de la presente invención han identificado una

35 secuencia en el ADNr 16S de *Enterobacter cloacae* que es específica para las especies de los géneros *Enterobacter*, *Pantoea* y para *Citrobacter koseri*, de forma que oligonucleótidos que contienen dicha secuencia pueden ser usados como sondas de género para la identificación de microorganismos pertenecientes a especies de dichos géneros.

40 Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella*. En otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.

45 El término “oligonucleótido”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un ácido nucleico de al menos 16, preferiblemente al menos 20, preferiblemente al menos 25 y, preferiblemente no más de 100 nucleótidos que es capaz de hibridar específicamente con un ADN genómico, con un ADNc, con un ARNm o con cualquier otro ácido nucleico de interés. La invención contempla tanto el uso de oligonucleótidos formados por nucleótidos convencionales unidos por enlaces fosfodiéster convencionales como variantes de los mismos que incluyen modificaciones en los restos de purina o pirimidina y modificaciones en los restos de ribosa o desoxirribosa. Modificaciones adecuadas en el contexto de la presente invención incluyen nucleótidos modificados con arabinosa, según se ha descrito

50 en WO2007/038869 así como nucleótidos que presentan en posición 2' del azúcar un substituyente seleccionado del grupo de fluoro, hidroxilo, amino, azido, alquilo, alcoxi y alcoxialquilo. En otra forma de realización de la invención, el grupo alquilo se selecciona del grupo metilo, etil, propil, butil o un grupo alquilo funcionalizado como etilamino, propilamino y butilamino. Alternativamente, el grupo alcoxi es metoxi, etoxi, propoxi o un grupo alcoxi funcionalizado según la fórmula -O(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-R, donde q es de 2 a 4 y R es un grupo amino, metoxi o etoxi. Grupos alcoxialquilo

55 adecuados son metoxietilo y etoxietilo. También forman parte de la invención oligonucleótidos en los que distintos nucleótidos contienen distintas modificaciones en posición 2'. Alternativa o adicionalmente, los oligonucleótidos de la invención pueden contener enlaces modificados tales como enlaces tipo fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoamidato, metilfosfonato, boranofosfonato así como combinaciones de los mismos o bien son péptidos ácidos nucleicos (Peptide nucleic acids, PNA), en los que

60 los distintos nucleótidos están unidos por enlaces amida.

La expresión “hibridación específica”, tal como se utiliza en la presente invención se refiere a que es posible elegir condiciones adecuadas que permiten la hibridación de la sonda con el ácido nucleico diana sin que exista una hibridación sustancial con ácidos nucleicos que carecen de la secuencia complementaria a la secuencia de la sonda.

65 En cada reacción de hibridación, las condiciones restrictivas pueden variarse mediante manipulación de tres factores: temperatura, concentración de sales y concentración de formamida. La alta temperatura y la baja concentración de sal aumentan las condiciones restrictivas. La formamida disminuye la temperatura de fusión del ADN, disminuyendo así la temperatura a la que se puede formar el híbrido entre dos cadenas de ácidos nucleicos.

## ES 2 330 820 B1

Condiciones típicas de hibridación altamente restrictivas incluyen la incubación de la sonda con la muestra que contiene el ácido nucleico diana en 6 X SSC (1 X SSC: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) y formamida al 40% a 42°C durante 14 horas, seguido de uno o varios ciclos de lavado usando 0,5 X SSC, SDS al 0,1% a 60°C. Alternativamente, condiciones altamente restrictivas incluyen aquellas que comprenden una hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°-55°C en 6XSSC y un lavado final a una temperatura de 68°C en 1-3XSSC. Las condiciones restrictivas moderadas comprenden la hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°C hasta unos 65°C en NaCl 0,2 o 0,3 M, seguida de lavado a aproximadamente 50°C hasta unos 55°C en 0,2X SSC, 0,1% SDS (sulfato de dodecilo y sodio). La invención contempla variaciones de las condiciones anteriormente descritas de forma que la sondas sean capaces de discriminar el polinucleótido diana de otros polinucleótidos que aparecen en microorganismos no diana.

El término “ADN 16S” tal como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica el ARNr 16S que forma parte de la subunidad 30S de los ribosomas procariotas. Los ADN 16S que se usan en el contexto de la presente invención incluyen el ADN 16S de *Klebsiella pneumoniae* (Número de acceso en GenEMBL: AF130982), el ADN 16S de *Raoultella planticola* (Número de acceso en GenEMBL: AF129443), el ADN 16S de *Enterobacter cloacae* (Número de acceso en GenEMBL: AJ251469).

La expresión “especies pertenecientes al género *Klebsiella*”, según se entiende en la presente invención, incluye todas aquellas cepas bacterianas que tienen las características del género *Klebsiella* según se define en Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (eds. Garrity, George M., Boone, David R. y Castenholz, Richard W., segunda edición, 2001) y en la publicación de Drancourt *et al.*, 2001, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001, 51:925-32. Ejemplos ilustrativos no limitativos de especies que forman parte del género *Klebsiella* incluyen *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella milletis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* y sus diferentes subespecies y similares.

La expresión “especies pertenecientes al género *Raoultella*”, según se entiende en la presente invención, incluye todas aquellas cepas bacterianas que tienen las características del género *Raoultella* según se define en Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (eds. Garrity, George M., Boone, David R. y Castenholz, Richard W., segunda edición, 2001) y en la publicación de Drancourt *et al.*, 2001, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001, 51:925-32. Ejemplos ilustrativos no limitativos de especies que forman parte del género *Raoultella* incluyen *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Raoultella terrigena*.

La expresión “especies pertenecientes al género *Enterobacter*”, según se entiende en la presente invención, incluye todas aquellas cepas bacterianas que tienen las características del género *Enterobacter* según se define en Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (eds. Garrity, George M., Boone, David R. y Castenholz, Richard W., segunda edición, 2001). Ejemplos ilustrativos y no limitativos de especies que forman parte del género *Enterobacter* incluyen *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cowanii*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter nickellidurans*, *Enterobacter nimipressuralis*, *Enterobacter pulveris*, *Enterobacter pyrinus*, *Enterobacter radicincitans*, *Enterobacter turicensis* y similares.

La expresión “especies pertenecientes al género *Pantoea*”, según se entiende en la presente invención, incluye todas aquellas cepas bacterianas que tienen las características del género *Pantoea* según se define en Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (eds. Garrity, George M., Boone, David R. y Castenholz, Richard W., segunda edición, 2001). Ejemplos ilustrativos y no limitativos de especies que forman parte del género *Pantoea* incluyen *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea cedenensis*, *Pantoea citrea*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea endophytica*, *Pantoea oleae*, *Pantoea stewartii* y similares.

En una forma preferida de realización, el oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies del género *Klebsiella* y *Raoultella* es un oligonucleótido que comprende la secuencia correspondientes a las posiciones 434 a 452 del ADN 16S de *Klebsiella pneumoniae* y *Raoultella planticola* (SEQ ID NO:3) o una variante funcionalmente equivalente de la misma. En otra forma preferida de realización, el oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies del género *Enterobacter*, *Pantoea* y *Citrobacter koseri* es un oligonucleótido que comprende la secuencia correspondiente a las posiciones 442 a 457 del ADN 16S de *Enterobacter cloacae* (SEQ ID NO:5) o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Por variante funcionalmente equivalente de una secuencia se entiende toda aquella secuencia que pueda ser obtenida mediante inserción, delección y/o sustitución de uno o más nucleótidos de aquella y que mantenga sustancialmente intacta su capacidad de hibridar bajo condiciones muy estrictas con su secuencia diana. Métodos adecuados para identificar variantes funcionalmente equivalentes de las secuencias de SEQ ID NO:3 y 5 incluyen la realización de estudios de FISH sobre cultivos puros de cepas de referencia en las condiciones que se especifican en el ejemplo 3.

En otra forma preferida de realización, el oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies del género *Klebsiella* y *Raoultella* es un oligonucleótido que consiste en la secuencia SEQ ID NO:3 y el oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies del género *Enterobacter* y *Pantoea* es un oligonucleótido que consiste en la secuencia SEQ ID NO:5.

Los oligonucleótidos objeto de la presente invención definidos anteriormente pueden conjugarse a una molécula fluorescente para así poder ser usados para la detección de enterobacterias mediante FISH. Así, en otro aspecto, la

## ES 2 330 820 B1

invención se relaciona con una sonda que comprende un oligonucleótido oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies del género *Klebsiella* y *Raoultella* acoplado a un marcador fluorescente y a un oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies del género *Enterobacter* y *Pantoea* acoplado a un resto fluorescente.

5

Por “resto fluorescente”, según se usa en el contexto de la presente invención, se entiende cualquier molécula capaz de emitir una radiación electromagnética en respuesta a la absorción de una radiación de excitación en donde la longitud de onda de la radiación emitida es distinta que la longitud de onda de la radiación de excitación y en donde la emisión de radiación persiste únicamente mientras se mantiene la radiación de excitación. Ejemplos ilustrativos pero no limitativos de marcadores fluorescentes que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluyen:

10

TABLA 1

15

*Colorantes fluorescentes comúnmente empleados*

Molécula	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FAM	488	518
HEX	488	556
TET	488	538
CY3	550	570
CY5.5	675	694
JOE	527	548
6-ROX	575	602
Cascade Blue	400	425
Fluoresceína	494	518
Texas Red	595	615
Rodamina	550	575
Rodamina Green	502	527
Rodamina Red	570	590
Rodamina 6G	525	555
6-TAMRA	555	580
5-TMRIA	543	567
Alexa 430	430	545
Alexa 488	493	516
Alexa 594	588	612
Bodipy R6G	528	550

20

25

30

35

40

En una forma preferida de realización, el resto fluorescente se selecciona del grupo de fluoresceína (FITC), hexaclorofluoresceína (HEX) y CY3.

45

Adicionalmente, la invención se relaciona con una sonda que comprende un oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de la familia *Enterobacteriaceae* marcado acoplado a un resto fluorescente. En una forma preferida de realización, el oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de la familia *Enterobacteriaceae* es la región identificada por Hulton, C.S.J. *et al.* (Mol. Microbiol., 1991, 5:825-834). En una forma preferida de realización, el oligonucleótido que hibrida específicamente con la región intergénica repetitiva consenso (ERIC) de la familia *Enterobacteriaceae* comprende la secuencia SEQ ID NO:6. En una forma de realización aún más preferida, el oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de la familia *Enterobacteriaceae* consiste en la secuencia SEQ ID NO:6.

50

55

Los marcadores fluorescentes que pueden ser acoplados a la sonda específica para la región consenso ERIC, según la presente invención, son los mismos que se han señalado anteriormente en el caso de las sondas específicas de género. Preferiblemente, los marcadores fluorescentes se seleccionan del grupo de fluoresceína (FITC), hexaclorofluoresceína (HEX) y CY3.

60

Los oligonucleótidos y las sondas objeto de la invención tienen una especial utilidad para la detección de enterobacterias y, más en particular, para la identificación de enterobacterias formadoras de biopelículas, preferiblemente para la identificación de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter*, y *Pantoea*. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de al menos un oligonucleótido de la invención para la detección de enterobacterias, preferiblemente para la detección de enterobacterias pertenecientes al género *Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter* y *Pantoea*.

65

## ES 2 330 820 B1

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella*. En otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Raoutella* que comprende

10

(a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella* según la invención en condiciones adecuadas para la hibridación de dichas sondas con el material genético perteneciente a los microorganismos de dichos géneros.

15

(b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de enterobacterias pertenecientes al género *Raoutella* que comprende

20

(a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella* y con al menos una sonda específica para los microorganismos del género *Klebsiella* y

25

(b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra,

en donde las enterobacterias del género *Raoutella* aquellas marcadas con la sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella* pero no con la sonda que hibrida de forma específica con los microorganismos del género *Klebsiella*.

30

En una forma preferida de realización, la sonda que hibrida de forma específica con los microorganismos del género *Klebsiella* comprende un oligonucleótido que comprende o consiste en la secuencia definida en SEQ ID NO:8 acoplada a un marcador fluorescente.

35

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* que comprende

40

(a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* en condiciones adecuadas para la hibridación de dichas sondas con el material genético perteneciente a los microorganismos de dichos géneros y

45

(b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de enterobacterias en una muestra de bacterias pertenecientes a la especie *Enterobacter aerogenes* Bac que comprende

50

(a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella* y con al menos una sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* y en condiciones adecuadas para la hibridación de dichas sondas con el material genético perteneciente a los microorganismos de dichos géneros y

55

(b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra

en donde los microorganismos pertenecientes a la especie *Enterobacter aerogenes* Bac son aquellos marcados simultáneamente con al menos una sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoutella* y con al menos una sonda que hibrida de forma específica con el ADNr 16S de especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.

60

La invención permite el análisis de prácticamente cualquier muestra que pueda estar contaminada con una población de enterobacterias. Típicamente, la muestra es una población bacteriana asociada a un procedimiento industrial de producción de bienes de consumo como por ejemplo industrias papeleras, industrias heladeras, industrias petroleras, industrias aceiteras, cerveceras y de tratamiento de aguas residuales o asociada a un procedimiento de manipulación de fluidos biológicos en el entorno sanitario como sistema de perfusión entéricos, sistemas de diálisis, catéteres y

65

## ES 2 330 820 B1

similares. Alternativamente, la muestra puede ser de origen biológico y comprender tejidos, células, extractos celulares, homogenados celulares, fracciones proteicas, fluidos biológicos (sangre, suero, plasma, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor, etc.). Alternativamente, la muestra puede consistir en órganos enteros tales como músculo, ojo, piel, gónadas, nódulos linfáticos, corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, tumores.

5

La muestra se prepara de forma que sea accesible a las sondas de la invención. Preferiblemente, la muestra se permeabiliza mediante el uso de lisozima seguido de un tratamiento de deshidratación con concentraciones crecientes de etanol de 70%, 90% y 96%.

10

Los métodos de FISH permiten detectar la presencia de una determinada especie de polinucleótido pero no proporcionan ninguna información sobre la viabilidad celular. Por ello, en una forma de realización, el método de determinación de la presencia de una enterobacteria perteneciente al género de *Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter*, y *Pantoea*, de acuerdo con la invención, comprende una etapa adicional en la que se determina la viabilidad celular.

15

La viabilidad celular se puede determinar bien mediante la cuantificación directa del número de células viables o mediante la diferencia entre el número de células totales y el número de células no viables. Los métodos para la determinación del número de células viables que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención son ampliamente conocidos para el experto en la materia, e incluyen, sin limitación, las medidas de dispersión óptica, medidas potenciométricas y determinaciones redox. En una forma preferida de realización, la determinación de la viabilidad celular se efectúa mediante el uso de compuestos capaces de acceder al interior celular en donde son modificados por enzimas intracelulares, principalmente esterases, para dar lugar a un compuesto detectable que queda retenido en el interior celular. Ejemplos de este tipo de compuestos se han descrito en "The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies", capítulo 15 (Molecular Probes Inc.) e incluyen las denominadas calceínas, BCECF AM, diacetato de fluoresceína, diacetato de carboxifluoresceína, diacetato de sulfofluoresceína, Green CMFDA, diacetato de pentafluorobenzoil aminofluoresceína, acetato de clorometil SNARF-1 y diacetato de carboxinaftofluoresceína.

20

25

30

Preferiblemente, la viabilidad celular se determina mediante la cuantificación del número de células no viables. Para este fin se utilizan los denominados colorantes de exclusión, que son compuestos capaces de acceder al interior de células con una integridad de membrana comprometida pero que son excluidos completamente por células vivas. Preferiblemente, estos compuestos son capaces de unirse al ADN generando de esa manera aductos fluorescentes que facilitan la detección a la vez que eliminan la necesidad de efectuar lavados entre la adición del compuesto y la visualización de la muestra al microscopio. Compuestos de este tipo han sido descritos en "The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies", capítulo 15 (Molecular Probes Inc.) e incluyen el SYTOX Green, el SYTOX Orange, el SYTOX Blue, TOTO, TO-PRO, yoduro de propidio, bromuro de etidio, homodímero de etidio 1, monoazida de etidio, yoduro de hexidio. En una forma preferida de realización, el colorante de exclusión es el yoduro de propidio.

35

40

Las células se incuban con el colorante de exclusión durante el tiempo necesario y a la concentración necesaria, siendo ambos parámetros determinables de forma rutinaria por el experto en la materia. Una vez terminada la incubación con el colorante de exclusión, se efectúan uno o varios lavados en caso de que sea necesario y, a continuación, se inspeccionan las células. El experto en la materia apreciará que el marcaje de las células con las sondas de familia y/o de género y el marcaje con el colorante de exclusión puede ser llevado a cabo en cualquier orden, simultáneamente e incluso en paralelo sobre muestras distintas de la misma población bacteriana. Las condiciones para la determinación de la fluorescencia emitida por los distintos colorantes vitales o colorantes de exclusión se determina usando las técnicas a disposición del experto en la materia. El experto en la materia apreciará que es posible la determinación simultánea de células vivas, usando alguno de los colorantes vitales descritos anteriormente, y de células muertas usando los colorantes de exclusión citados anteriormente. Cuando se lleva a cabo un doble marcaje, es preferible efectuar la detección de las células vivas y muertas mediante citometría de flujo.

45

50

En una forma preferida de realización, la determinación del número de células muertas mediante el uso de colorantes de exclusión se lleva a cabo simultáneamente a la determinación del número de células totales, de forma que el número de células viables se puede determinar a partir de la diferencia entre el número de células totales y el número de células no viables. En una forma preferida de realización, el número total de células se determina mediante el uso de colorantes que son capaces de atravesar la membrana plasmática de células, tanto vivas como muertas, para interactuar con el ADN y dar lugar a un complejo fluorescente. Colorantes adecuados para este propósito incluyen SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, SYBR Green I, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTO 16, SYTOX, SYTO BC, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, y PicoGreen. En una forma preferida de realización, el colorante usado para determinar el número de células totales es DAPI. En otra forma de realización, dicho colorante es SYTO13.

55

60

En otra forma preferida de realización, el número total de células se determina mediante el uso de una sonda capaz de hibridar específicamente con todos los microorganismos del superreino Eubacteria. En una forma de realización aún más preferida, dicha sonda es capaz de hibridar con el ADNr 16S de dichos microorganismos. Preferiblemente, la sonda que se utiliza para determinar el número total de células es la sonda EUB338 (SEQ ID NO: 7).

65

En una forma preferida de realización, la muestra de bacterias en la que se quiere detectar la presencia de enterobacterias es una muestra que se encuentra inmovilizada en un soporte. Por "población bacteriana inmovilizada" se

entiende, en el contexto de la presente invención, un conjunto de bacterias cuyo movimiento libre de flotación en el medio se encuentra parcial o totalmente restringido mediante interacciones con otros organismos y/o con un soporte sólido.

5 Poblaciones inmovilizadas que pueden ser analizadas de acuerdo a la presente invención incluyen biopelículas, en las que las poblaciones se encuentran inmovilizadas dentro de una matriz producida por exopolisacáridos secretados por las propias bacterias y, normalmente, asociados a una superficie. Habitualmente, las biopelículas se forman sobre una superficie que puede ser abiótica (acero inoxidable, estaño, aluminio, titanio, cromo o cualquier metal que tiene una superficie de óxido cristalino, cloruro de polivinilo, poliestireno y otros plásticos poliméricos, cristal, silicatos, cerámica y similares) o biótica (el esmalte de los dientes). Alternativamente, las células pueden ser células originalmente en suspensión o células procedentes de una biopelícula que ha sido previamente disgregada y que han sido inmovili-  
10 zadas sobre un soporte usando métodos conocidos para el experto en la materia (filtración, centrifugación y similares). En una forma de realización preferida, el soporte es una matriz tridimensional. En una forma de realización aún más preferida, la matriz tridimensional es una matriz microporosa. Prácticamente cualquier soporte microporoso puede ser empleado en la presente invención, siempre que sea adecuado para el cultivo de células en suspensión y que el tamaño del poro sea lo suficientemente pequeño para que no escapen las bacterias de su interior. Materiales adecuados para preparar soportes microporosos de acuerdo con la presente invención incluyen gelatina (Cultispher G, HyClone), celulosa (Cytocell, Pharmacia), polietileno (Cytoline 1 and 2, Pharmacia), silicona (Immobilisil, Ashby Scientific), colágeno (Microsphere, Cellex Biosciences), cristal (Siran, Schott Glassware), copolímeros acrílicos, de acrilamida, metilen-bis-acrilamida, dimetilaminopropil, metacrilamida, metacrilato de metilmetacrilato, etileno/ácido acrílico, acrilonitrilo butadienestireno (ABS), ABS/policarbonato, ABS/polisulfona, ABS/cloruro de polivinilo, etileno propileno, etilvinilacetato (EVA), nitrocelulosa, poliácridonitrilo (PAN), poliácridato, policarbonato, polibutilentereftalato (PBT), polietilentereftalato (PET), polímeros y copolímeros de polipropileno, poliestireno, politetrafluoroetileno (PTFE), etileno-propileno fluorado (FEP), etilentetrafluoroetileno (ETFE), perfluoroalcoxi-etileno (PFA), fluoruro de polivinilo (PVF), fluoruro de polivinilideno (PVDF), policlorotrifluoroetileno (PCTFE), etilenclorotrifluoroetileno (ECTFE), alcohol polivinílico (PVA), estirenacrilonitrilo (SAN), estireno-anhídrido maléico (SMA).

Una vez que las células se han marcado con las distintas sondas y agentes adecuados, es necesario determinar la emisión fluorescente asociada a las sondas específicas para la determinación del número de enterobacterias de los distintos géneros así como la emisión originada por los agentes usados para la determinación del número total de células y para la determinación del número de células viables. La determinación de la emisión fluorescente por cada uno de los marcadores se puede llevar a cabo mediante FISH así como mediante citometría de flujo. El experto en la materia apreciará que, en el caso de las células que se han hecho crecer sobre filtros, es más adecuada la determinación mediante FISH, mientras que en el caso de células en suspensión, se puede emplear tanto la citometría de flujo, directamente sobre la población celular, como la FISH si la población celular se fija sobre un soporte tal y como se ha indicado anteriormente. La determinación de la emisión fluorescente mediante FISH se lleva a cabo mediante protocolos conocidos para el experto en la materia (véase por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc.; 2003, unidad 14.7).

40 Los oligonucleótidos y sondas objeto de la presente invención son particularmente útiles para la caracterización de poblaciones bacterianas en las que se sospecha que puede existir, en mayor o menor medida, enterobacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter* y *Pantoea* puesto que permiten la detección de distintos géneros pertenecientes a dicha familia, así como la determinación del porcentaje de dichos microorganismos con respecto al total de enterobacterias. Así, en otra forma preferida de realización, la invención se relaciona con un método para la caracterización de la población bacteriana que comprende

- (a) poner en contacto dicha población inmovilizada con un oligonucleótido específico para los microorganismos pertenecientes al género *Klebsiella* y *Raoultella*
- (b) determinar el número de células que muestran una señal de hibridación con dicho oligonucleótido y el número total de células en la muestra

en donde el porcentaje de células que hibridan con el oligonucleótido con respecto al número total de células totales indica el porcentaje de microorganismos pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*.

55 En una forma preferida de realización, la muestra a analizar se pone en contacto en la etapa (a) simultáneamente con un oligonucleótido específico para los microorganismos pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*, en donde el porcentaje de células positivas para dicho oligonucleótido indica el porcentaje de microorganismos pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.

60 En otra forma preferida de realización, la invención se relaciona con un método para la caracterización de la población bacteriana que comprende

- (a) poner en contacto dicha población inmovilizada con un oligonucleótido específico para los microorganismos pertenecientes al género *Enterobacter* y *Pantoea*.
- (b) determinar el número de células que muestran una señal de hibridación con dicho oligonucleótido y el número total de células en la muestra

## ES 2 330 820 B1

en donde el porcentaje de células que hibridan con el oligonucleótido con respecto al número total de células totales indica el porcentaje de microorganismos pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.

5 En una forma preferida de realización, la muestra a analizar se pone en contacto en la etapa (a) simultáneamente con un oligonucleótido específico para los microorganismos pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, en donde el porcentaje de células positivas para dicho oligonucleótido indica el porcentaje de microorganismos pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*.

10 En otra forma preferida de realización, la muestra cuya población bacteriana se desea caracterizar se pone en contacto en la etapa (a) con un oligonucleótido que hibrida específicamente con la región intergénica repetitiva consenso (ERIC) de los microorganismos de la familia enterobacteria, en donde el porcentaje de células positivas con respecto al número de células totales para dicho oligonucleótido indica el porcentaje de enterobacterias en la muestra.

15 Los oligonucleótidos específicos para los distintos grupos de géneros así como para las enterobacterias han sido definidos anteriormente. En una forma preferida de realización, la sonda que hibrida específicamente con la región intergénica repetitiva consenso (ERIC) comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:6.

20 En una forma preferida de realización, los oligonucleótidos específicos para *Klebsiella* y *Raoultella*, los oligonucleótidos específicos para *Enterobacter* y *Pantoea* y los oligonucleótidos específicos para la región intergénica repetitiva consenso (ERIC) se han marcado, respectivamente, con un primer, con un segundo y con un tercer marcador fluorescente. El experto en la materia apreciará que la elección de marcadores para los tres oligonucleótidos ha de ser tal que no exista un solapamiento sustancial en las longitudes de onda de la radiación de emisión de forma que sea posible la detección simultánea e individualizada de los tres marcadores. Combinaciones de tres marcadores que pueden ser usados simultáneamente incluyen FITC, Cy3 y rodamina, ácido acético amino metil cumarina (AMCA),  
25 FITC y TRITC, FITC, R-PE y PE-Cy5, Cy2, PE-Texas Red y PE-CY5.5, Alexa 488, Cy3 y PE-Alexa 647, Cy3, FITC y Cy5, FITC, rodamina y cumarina, FITC, Texas Red y Cy5 y similares.

En una forma preferida de realización, la detección de las células marcadas con el primer, segundo y/o tercer oligonucleótido se lleva a cabo mediante FISH. Para ello, se emplean los métodos descritos anteriormente.

30 Preferiblemente, la determinación del número total de células se lleva a cabo mediante el uso de un agente intercalante de ADN capaz de detectar todas las células o mediante el uso de una sonda capaz de hibridar con todos los microorganismos del superreino Bacteria. Ejemplos de dichos agentes intercalantes y de sondas adecuados para la realización de la invención han sido descritos anteriormente. Preferiblemente, la determinación del número total de  
35 células se lleva a cabo mediante FISH o mediante citometría de flujo. Preferiblemente, la población celular cuya composición en enterobacterias se desea estudiar se encuentra inmovilizada, bien en forma de biopelícula inmovilizada por los exopolisacáridos producidos por los propios microorganismos de la biopelícula, bien mediante un soporte sólido sobre el que se han aplicado los microorganismos previamente en suspensión mediante filtración o centrifugación.

40 Las sondas y oligonucleótidos de la presente invención, cuando se usan simultáneamente con los métodos de determinación de la viabilidad celular, permiten determinar la eficacia de un tratamiento antibacteriano sobre las enterobacterias que forman parte de una biopelícula. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar la eficacia de un tratamiento antibacteriano sobre las enterobacterias que forman una biopelícula que comprende las etapas de

- 45 (a) someter la biopelícula a un tratamiento antibacteriano
- (b) poner en contacto dicha biopelícula con al menos una sonda de la invención específica que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de la familia *Enterobacteriaceae* marcado  
50 acoplado a un resto fluorescente y
- (c) determinar el porcentaje de células positivas para la sonda o sondas aplicada o aplicadas en la etapa (a) con respecto el número total de células

55 en donde una reducción del valor determinado en la etapa (c) con respecto al valor determinado en ausencia de tratamiento antibacteriano es indicativo de que el tratamiento es particularmente eficaz para eliminar las enterobacterias de la biopelícula.

60 Por tratamiento antibacteriano se entiende, en el contexto de la presente invención, tratamientos que interfieren con el metabolismo de las bacterias encaminados a matar o detener el crecimiento de las bacterias que forman parte de las biopelículas así como a tratamientos encaminados a solubilizar total o parcialmente la biopelícula para aumentar la accesibilidad de tratamientos bactericidas o bacteriostáticos convencionales a los microorganismos allí presentes, así como a los métodos encaminados a desprender la biopelícula de su soporte biótico o abiótico.

65 Métodos de tratamiento antibacteriano que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluyen, dependiendo del tipo de superficie a ser tratada, precipitación de plata coloidal, extirpación mediante láser y pulsos de campo eléctrico, limitación de nutrientes esenciales, cloración, destrucción mecánica, tratamiento con ozono, uso de bacteriófagos, péptidos antimicrobianos, inhibición de los mecanismos de interacción de los microorganismos

## ES 2 330 820 B1

dentro de la biopelícula (quórum-sensing), inhibición de la colonización, modificación de la superficie para impedir su colonización mediante hidrofiliación, nanoestructuración, introducción de cargas negativas, tratamiento con plasma, recubrimiento con antibióticos o antisépticos, incorporación de metales tóxicos, recubrimiento con microorganismos no patógenos y similares.

Preferiblemente, la determinación del número total de células se lleva a cabo mediante el uso de un agente intercalante de ADN capaz de detectar todas las células o mediante el uso de una sonda capaz de hibridar con todos los microorganismos del superreino Bacteria. Ejemplos de dichos agentes intercalantes y de sondas adecuados para la realización de la invención han sido descritos anteriormente. Preferiblemente, la determinación del número total de células se lleva a cabo mediante FISH o mediante citometría de flujo.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que tienen un carácter ilustrativo y en ningún caso limitativo.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Diseño de las sondas de oligonucleótidos*

El diseño de sondas para la detección de géneros comúnmente involucrados en la formación de la biopelícula se realizó basándose en las secuencias 16S ADN de los diferentes géneros de *Enterobacteriaceae*.

La sonda KPN- 1 (5'- AAGGCGTTAAGGTTAATAA-3') fue diseñada para marcar principalmente la región 16S ADN de las especies formadoras de biopelícula *Klebsiella* y *Raoultella*. Esta sonda fue diseñada a partir de las posiciones 434-452 del ADN que codifica la región 16S-RNA de *K. pneumoniae* y *R. planticola* respectivamente (número de acceso AF130982 y AF129443).

La sonda ENT-1 (5'-CAGCAATTGACGTTAC-3'), se diseñó basándose en las posiciones 442-445 del ADN que codifica la región 16S-RNA del *E. cloacae* (número de acceso AJ251469). El diseño de las sondas también se realizó teniendo en cuenta el programa ARB (Kumar, Y. *et al.*, 2005, BMC Bioinformatics, 6:61).

La sonda ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') marca las secuencias intergénicas consenso repetitivas del género *Enterobacteriaceae* (Hulton, C.S.J. *et al.*, 1991, Mol. Microbiol., 5:825-834). Estas sondas fueron marcadas en su extremo 5' con un derivado del isotiocianato (CY3) o con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a través de un enlace covalente, y purificadas con cromatografía líquida en fase inversa.

La sonda Kpn publicada previamente (Kempf, V.A.J., 2000, J. Clin. Microbiol. 38:830-838) (5'-CCTACACAC CAGCGTGCC-3'), específica para *K. pneumoniae*, está dirigida a la región 23.S RNA de esta bacteria. La sonda EUB\_338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), complementaria a la región 16S ARN es específica para el dominio bacteriano, fue usada como control positivo para probar la efectividad de hibridación (Amann, R.I. *et al.*, 1995, Microbiol. Rev., 59:143-169). Las sondas fueron sintetizadas por Transgenomic (UK). Alternativamente, las muestras fueron marcadas con DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol) que detecta el ADN de todas las bacterias y otros microorganismos.

#### Ejemplo 2

##### *Control de la sonda y optimización de la rigurosidad de la hibridación*

La efectividad de hibridación de las sondas de oligonucleótidos fue estimada por el seguimiento de la intensidad de fluorescencia de los cultivos puros usados como blanco. Toda la hibridación celular fue hecha a diferentes temperaturas con aumento en las concentraciones de formamida (desde 0 a 50% v/v, en aumentos del 10%) para determinar las condiciones de discriminación entre las células blanco y las no blanco para cada sonda. Las sondas específicas de especie y grupo fueron incubadas simultáneamente con la sonda EUB338.

#### Ejemplo 3

##### *Hibridación *in situ* sobre filtros de membrana*

Los cultivos celulares fueron seleccionados en fase logarítmica, centrifugados y resuspendidos en 0.5 ml de PBS, 30  $\mu$ l de la suspensión celular fueron ajustados a  $10^5$ - $10^7$  células/cm<sup>2</sup>. Estas suspensiones fueron colocadas sobre filtros de policarbonato (47 mm de diámetro, con un tamaño de poro de 0.2  $\mu$ m; Isopore GTTP, Millipore, Alemania) mediante filtración. Las células fueron permeabilizadas con diferentes concentraciones de lisozima (Sigma lisozima en solución buffer que contenía Tris-HCl al 50 mM EDTA pH 8). Se ensayaron distintas temperaturas y tiempos de incubación para optimizar la permeabilización celular. Las células fueron lavadas dos veces con 2 ml de PBS y deshidratadas usando series de etanol 70, 90 y 96% (v/v) durante 10 min a temperatura ambiente. Los filtros se secaron al aire quedando así preparados para la hibridación. Estos filtros pueden ser almacenados a 20°C durante varias semanas sin cambios aparentes. Cada filtro fue cortado en ocho secciones y fueron colocados en portaobjetos de vidrio. Cada sección de los filtros puede ser usada con sondas por separado o combinadas. Los filtros fueron calentados con una solución de formamida 2XSSC (formamida al 70%, NaCl 0.3M y citrato sódico 0.03 M, pH 7) a

## ES 2 330 820 B1

70°C, 2 min. Las secciones de los filtros fueron cubiertas con 50  $\mu\text{l}$  de buffer de hibridación (NaCl 0.9 M, y Tris-HCl 20 mM, pH 7), y las sondas fluorescentes fueron añadidas a una concentración final de 8 ng  $\cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Posteriormente se incubaron los filtros a la temperatura apropiada en un horno de hibridación. Después de 12 h de incubación, los filtros se transfirieron a un vial precalentado que contenía 50 ml de solución de lavado (NaCl 0.9 M, SDS 0.05% y Tris-HCl 20 mM, pH 7) y se incubaron sin agitación durante 20 min. Los filtros se aclararon con agua destilada, se secaron al aire y se dispusieron con el medio de montaje Vectashield.

### Ejemplo 4

#### 10 *Microscopía láser confocal y análisis de imagen*

La señal emitida por las sondas fluorescentes se detectó usando un microscopio confocal MRC-1024 (Bio-Rad, Hempel Hempstead, UK). Las sondas marcadas con FITC se excitaron usando un láser Ar que emite a 488 nm, y la fluorescencia fue recuperada a través de un filtro 515/30 BP. La sonda marcada con HEX se excitó usando un láser He-Ne que emite a 543 nm. La fluorescencia fue recuperada usando un filtro 600/30 BP. Cuando las sondas marcadas con FITC y HEX fueron usadas en la misma muestra, la adquisición de imágenes fue realizada de forma secuencial. Los programas Lasersharpe y Laserpix (Bio-Rad) fueron usados para el análisis de imagen.

### Ejemplo 5

#### 20 *Análisis de viabilidad celular mediante citometría de flujo*

Con el fin de obtener información sobre la viabilidad celular, se seleccionó yoduro de propidio (Sigma) como colorante de exclusión y se combinó con SYTO 13 (Molecular Probes) como colorante de ADN de supervivencia. Ambos colorantes se añadieron simultáneamente a concentraciones de 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de yoduro de propidio y 2.5  $\mu\text{l}$  de SYTO 13 a una muestra de 1 ml y se incubaron durante 10 minutos a 37°C para la tinción. Se usó un citómetro FACScalibur con un láser que emitía a 488 nm. Las muestras se analizaron a baja velocidad y se adquirieron los datos en modo de registro mediante la captación de 10000 sucesos (Gasol, J.M., *et al.*, *Apl. Environ. Microbiol.*, 65:4475-4483). Las células con membranas dañadas fueron penetradas tanto por el colorante de exclusión, yoduro de propidio, como por el colorante SYTO 13.

### Ejemplo 6

#### *Condiciones para la optimización de la hibridación*

Las condiciones óptimas para la aplicación del FISH fueron determinadas sobre cepas formadoras de biopelícula (CFB) seleccionadas: *Enterobacter cloacae* E-022114 y 022119, *Enterobacter aerogenes* Bac, *Raoultella planticola* E-022116 y *Klebsiella pneumoniae* E-11927. Para aumentar la sensibilidad de la hibridación (por ejemplo, el porcentaje de células hibridadas en las células marcadas con DAPI) de las CFB analizadas, es necesario considerar que se pueden obtener señales débiles cuando hay un número pequeño o una baja disponibilidad de las secuencias blanco o debido a una mala permeabilidad de las células fijadas (FH1).

### Ejemplo 7

#### *Especificidad de la sonda*

La especificidad de las sondas de oligonucleótidos ERIC-1, ENT-1 y KPN-1 para la CFB blanco fue evaluada mediante la realización de ensayos FISH, con cultivos puros de CFB aisladas de la industria papelera y con cepas de referencia, bajo las condiciones descritas en la tabla 2.

TABLA 2

*Optimización de hibridación sobre células completas usando las distintas sondas sobre bacterias formadoras de biopelículas*

Bacteria	Lisozima (mg ml <sup>-1</sup> )	Formamida (%)			Temperatura (°C)		
		ERIC1r	KPN-1	ENT-1	ERIC1r	KPN-1	ENT-1
<i>E. cloacae</i> E-022114	1.0	20		10	57		37
<i>E. cloacae</i> E-022119	1.0	0		10	55		37
<i>R. planticola</i> E-022116	0.1	0	30		55	40	
<i>E. aerogenes</i> Bac	0.1	20	20	10	57	43	37
<i>K. pneumoniae</i> E-011927	0.1	20	30		59	40	

## ES 2 330 820 B1

En el caso de las sondas Kpn y EUB338, los ensayos fueron llevados a cabo según ha sido descrito por otros autores (Kempf, V.A.J. *et al.*, 2000, J. Clin. Microbiol., 38:830-838 y Peters, R.P.H. *et al.*, 2006, J. Clin. Microbiol., 44:11-123). Los conteos celulares obtenidos de los experimentos realizados se observan en la tabla 3. Los resultados obtenidos con la sonda ERIC-1 muestran que las cinco cepas de CFB fueron marcadas con éxito con esta sonda específica para el grupo *Enterobacteriaceae*. La máxima efectividad de FISH fue observada con la cepa de *K. pneumoniae* 11927 (92±1.2%), y la más baja con la cepa de *E. aerogenes* Bac (82±1.4%).

No se pudo diseñar una sonda específica para *Enterobacter sp.* en las secuencias 16S ARNr. En realidad, la sonda ENT-1 es complementaria a *Pantoea sp.* y a *Citrobacter koseri*, como se evidenció con el programa de alineamiento de secuencias de tipo local BLAST. Los resultados (tabla 3) muestran que la máxima efectividad de FISH fue obtenida con *E. cloacae* E-022114 y 022119. Aunque una baja sensibilidad de hibridación (86±0.4%) fue detectada con la cepa de *E. aerogenes* Bac. Las cepas de *R. planticola* E-022116 y *K. pneumoniae* E-11927 no fueron marcadas con ENT-1 y ninguna otra de las cepas de enterobacterias fueron marcadas con esta sonda.

Se obtuvieron resultados satisfactorios cuando se utilizó la sonda KPN-1 en experimentos FISH para detectar los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*. Las cepas *K. pneumoniae* 11927, *K. oxytoca* DSZ-2 y *R. planticola* E-022116 mostraron una alta señal de intensidad de fluorescencia relacionada con una alta efectividad de hibridación (tabla 3). Sin embargo, la fluorescencia con esta sonda fue también observada con *E. aerogenes* Bac. Además de esto, la especificidad de la sonda KPN-1 fue establecida con los resultados obtenidos con las otras enterobacterias ensayadas y ninguna de estas cepas fue marcada con la KPN-1 en los experimentos FISH. Finalmente, la sonda de género específica Kpn hibrida únicamente con *K. pneumoniae* 11927 y con *K. oxytoca* DSZ-2.

TABLA 3

*Detección de bacterias usando distintas sondas sobre filtros de membrana*

Cepas	Fracción total de células (%) (mediante DAPI) detectadas con sondas			
	EUB338	ERIC-1	KPN-1	ENT-1
<i>E. cloacae</i> E-022114	94±1.2	91±0.2	N.D.	94±0.3
<i>E. cloacae</i> E-022119	92±0.5	89±0.6	N.D.	92±0.2
<i>E. aerogenes</i> Bac	89±1.1	82±1.4	75±1.2	86±0.4
<i>K. pneumoniae</i> E-011927	97±0.9	92±1.2	96±1.5	N.D.
<i>R. planticola</i>	94±1.2	91±1.1	93±0.2	N.D.

N.D. No determinada

La alta sensibilidad obtenida con las sonda ENT-1 y KPN-1 puede ser debida a que uno de los criterios que se utilizó para elegir las secuencias que forman parte de la sonda fue la accesibilidad de dicha secuencia dentro de la estructura de ARNr. Así, las hibridaciones llevadas a cabo con la sonda KPN-1 demostraron su utilidad para detectar bacterias pertenecientes al grupo *Klebsiella/Raoultella*, aunque se observó fluorescencia también con *E. aerogenes* Bac. Sin embargo, la hibridación cruzada de la sonda KPN-1 con *E. aerogenes* no es sorprendente considerando que los estudios filogenéticos basados en la secuencia de ADNr 16S, *groE* y *gyrB* han propuesto transferir *E. aerogenes* al género *Klebsiella* (Dauga, C., 2002, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52:531-547). Aunque la sonda ENT-1, mostró una menor especificidad, esto no supone un inconveniente puesto que *Enterobacter*, *Pantoea* y, ocasionalmente, *Citrobacter* y *Serratia* se han descrito como formadores primarios de biopelículas ya que aparecen frecuentemente en el suelo, en madera sana y en putrefacción en plantas.

La distinción entre los microorganismos pertenecientes al género *Klebsiella* y *Raoultella* fue posible gracias al uso combinado de las sondas KPN-1 y Kpn. Además, el uso combinado de ENT-1 y KPN-1 permitió la identificación de *Enterobacter aerogenes*.

Como complemento a la optimización de la temperatura de FISH, se evaluó el efecto de los diferentes permeabilizantes, tales como formamida y lisozima (Tabla 2). La concentración óptima de lisozima fue diferente entre especies debido a la diferencia en la resistencia de la pared celular. Las cepas 022116, E-11927 y *E. aerogenes* Bac proporcionaron los mejores resultados con respecto a la tasa de detección con 0.1 mg/ml de lisozima mientras que las otras cepas fueron permeabilizadas adecuadamente con 1 mg/ml. Para cuantificar una posible pérdida de membrana se realizaron incubaciones con lisozima a temperatura ambiente a tiempos de 0, 30 y 60 min. No se detectaron pérdidas celulares

## ES 2 330 820 B1

significativas comparando los conteos con DAPI y FISH (con la sonda Eub338) en las muestras después de 60 min de tratamiento con la lisozima. Las muestras que no fueron tratadas con lisozima presentaron bajas señales de intensidad de fluorescencia y de efectividad de hibridación FISH.

5 En términos de efectividad de hibridación de FISH (con EUB\_338 y con las sondas específicas) los resultados mostraron un incremento de  $48\pm 3\%$  en las muestras sin permeabilizar a  $92\pm 5\%$  tras 60 min de permeabilización con la enzima. La máxima efectividad de hibridación fue observada cuando los cultivos celulares fueron seleccionados en fase de crecimiento exponencial. Las temperaturas óptimas de hibridación para cada cepa y sonda se encuentran en la tabla 2. Los tiempos de hibridación varían desde 2 h para EUB338, a 16 h para las sondas específicas.

10

### Ejemplo 8

#### *Ensayo de productos que inhiben la formación de biopelícula*

15

Se determinó el efecto de 3 tipos de compuestos reguladores de la formación de biopelículas sobre la viabilidad celular de enterobacterias:

20

- Agentes biocidas (por ejemplo Butrol 1009, Butrol 1072, Butrol 1130 y Buitrol 881) que atacan directamente a los microorganismos inhibiendo su metabolismo o secuestrando metales necesarios para el metabolismo.
- Dispersantes (por ejemplo Busperse) que actúan promoviendo la liberación de la biopelícula de su soporte, lo que hace a los microorganismos más vulnerables frente a la acción de compuestos biocidas o antisépticos.
- Enzimas (por ejemplo Buzyme) que actúan impidiendo la formación de las biopelículas, digiriendo los polisacáridos presentes en la biopelícula y, en algunos casos, dañando directamente a las células en la biopelícula. Este tratamiento por tanto, afecta la estructura celular, de modo que sólo las células en las que el tratamiento no tiene efecto serán las analizadas en posteriores experimentos de FISH.

25

30

La estructura química y el modo de acción de los distintos compuestos se recogen en la tabla 4.

TABLA 4

35

*Compuestos y enzimas inhibidores de la formación de biopelícula aplicados sobre bacterias formadoras de biopelículas*

40

	<b>Butrol 1009</b>	<b>Butrol 1072</b>	<b>Butrol 1130</b>	<b>Butrol 881</b>	<b>Buzyme</b>	<b>Busperse</b>
Química	TCMTB+MTC	TCMTB+MTC	BHAP	Tiocarbonato	Proteasa	Dispersante
	diluido					
Modo de acción	1,2	1,2	2	2	Enzimático	Dispersión

50

TCMTB: Tiocianometilbenzotiazol (efecto 1: Complejamiento de metales)

55

MTC: Metilenebistiocianato -> efecto 2 (Inhibición directa del metabolismo)

BHAP: Bromohidroxiactofenona -> efecto 2.

60

Cultivos puros de las bacterias seleccionadas en 250 ml de medio peptona salino se incubaron durante una noche a 37°C en un agitador. Posteriormente, alícuotas de 100 ml de cada cultivo incubado se mezclaron con el producto estudiado. Los efectos de 100 ppm de los distintos compuestos se analizaron a tiempos distintos (0 h, 2 h, 8 h y 24 h) mediante citometría de flujo.

65

Los estudios demostraron que no todos los compuestos usados en el control de biopelículas son igualmente eficientes. Así, Butrol 1009 y Butrol 1072 fueron los compuestos más efectivos contra las enterobacterias, puesto que permitieron obtener un 80% de células muertas tras 8 horas de tratamiento, mientras que Butrol 1130 no fue tan eficiente a la dosis empleada y Butrol 881 sólo fue eficiente sobre *E. cloacae* tras 24 h de tratamiento. Por otro lado,

## ES 2 330 820 B1

el efecto de los dispersantes dependió de la cepa estudiada. Así, Busperse fue muy eficiente sobre *E. cloacae* tras 2 horas de tratamiento, moderadamente eficiente sobre *K. pneumoniae* a tiempos cortos (2 h) pero muy eficiente tras 24 h, mientras que no mostró eficacia ninguna sobre *E. aerogenes*.

5 Por otro lado, el tratamiento con proteasas (Buzyme) fue muy eficiente sobre *K. pneumoniae*, resultando en más del 85% de bacterias muertas tras 2 h de tratamiento, eficiente sobre *E. cloacae*, produciendo más del 75% de bacterias muertas tras 2 h y moderadamente eficiente sobre *E. aerogenes*. En este último caso, solamente se observaron 80% de células muertas tras 2 h, aunque se observó un recrecimiento que llegó a alcanzar el 40% de las células vivas. Tras el tratamiento enzimático de las muestras de biopelículas, no se detectaron enterobacterias mediante FISH.

10

### Ejemplo 9

#### *Identificación de bacterias formadoras de biopelículas*

15

Se analizaron mediante FISH muestras de biopelículas obtenidas de una máquina de producción de papel usando las sondas ERIC-1, Kpn, KPN-1 y ENT-1. El experimento se repitió 3 veces y, en cada repetición, se llevaron a cabo las hibridaciones con al menos tres triplicados. El análisis mediante FISH con la sonda ERIC-1 sobre la población bacteriana de muestras de biopelículas demostró que las enterobacterias formaban un alto porcentaje de los microorganismos totales (Figura 1). Los resultados mostraron que un 45% de las células implicadas en la formación de biopelículas eran Enterobacterias. Se comprobó asimismo la especificidad de las sondas específicas de grupo mediante la identificación en las muestras de bacterias compatibles con *Klebsiella* sp. (14-16%) y *Enterobacter* sp. o *Pantoea* sp. (12%) (Tabla 5). Además, tras el tratamiento enzimático de las muestras de biopelículas, no se pudieron detectar enterobacterias mediante FISH, lo que demostró la efectividad del tratamiento bactericida sobre la población bacteriana, así como la utilidad del método de identificación.

25

TABLA 5

*Detección de bacterias usando las distintas sondas en las muestras de biopelículas de una industria papelera*

30

Fracción (%) de células totales (mediante DAPI) detectadas con las sondas:					
	Eub338	ERIC-1	KPN-1	Kpn	ENT-1
Biofilm 9	92±0.9	45±1.2	16±0.5	14±0.5	12±0.4
Después del tratamiento con BUZYME		15±0.3	N.D.	N.D.	N.D.
N.D. No detectada					

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 330 820 B1

### REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*.
2. Un oligonucleótido según la reivindicación 1 que comprende la secuencia correspondiente a las posiciones 434-452 del ADN de los polinucleótidos definidos en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
3. Un oligonucleótido según la reivindicación 2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:3.
4. Una sonda que comprende un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 acoplado a un marcador fluorescente.
5. Una sonda según la reivindicación 4 en la que el resto fluorescente se selecciona del grupo de isotiocianato de fluoresceína (FITC), hexaclorofluoresceína (HEX) y CY3.
6. Un oligonucleótido que hibrida específicamente con el ADNr 16S de especies de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.
7. Un oligonucleótido según la reivindicación 6 que comprende la secuencia correspondiente a las posiciones 442-457 del ADN del polinucleótido definido en SEQ ID NO:4 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
8. Un oligonucleótido según la reivindicación 7 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:5.
9. Una sonda que comprende un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 acoplado a un marcador fluorescente.
10. Una sonda según la reivindicación 9 en la que el resto fluorescente se selecciona del grupo de isotiocianato de fluoresceína (FITC), hexaclorofluoresceína (HEX) y CY3.
11. Una sonda que comprende un oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de organismos de la familia *Enterobacteriaceae* acoplado a un resto fluorescente.
12. Una sonda según la reivindicación 11 en el que oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de organismos de la familia *Enterobacteriaceae* comprende la secuencia SEQ ID NO:6.
13. Una sonda según la reivindicación 12 en el que oligonucleótido consiste en la secuencia SEQ ID NO:6.
14. Una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en la que el resto fluorescente se selecciona del grupo de isotiocianato de fluoresceína (FITC), hexaclorofluoresceína (HEX) y CY3.
15. Uso de al menos un oligonucleótido según las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 8 o de una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 y 9 a 14 para la detección de enterobacterias.
16. Uso según la reivindicación 15 en el que las enterobacterias pertenecen a un género seleccionado del grupo de *Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter*, y *Pantoea*.
17. Método para la detección de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, que comprende
- poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda según las reivindicaciones 4 ó 5 en condiciones adecuadas para la hibridación de las sondas con los microorganismos pertenecientes a dichos géneros.
  - detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra.
18. Método para la detección de enterobacterias pertenecientes al género *Raoultella* en una muestra que comprende
- poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda según las reivindicaciones 4 ó 5 y con una sonda específica para los microorganismos del género *Klebsiella*, en condiciones adecuadas para la hibridación de las sondas con los microorganismos pertenecientes a dichos géneros y
  - detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótidos que han hibridado con la muestra

## ES 2 330 820 B1

en donde las enterobacterias del género *Raoultella* son aquellas marcadas con la sonda según las reivindicaciones 4 ó 5 pero no con la sonda específica del género *Klebsiella*.

19. Método según la reivindicación 18 en el que la sonda específica del género *Klebsiella* comprende un oligonucleótido que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:8 acoplada a un marcador fluorescente.

20. Método para la detección en una muestra de enterobacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* que comprende

10 (a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene dichas enterobacterias con al menos una sonda según las reivindicaciones 9 ó 10 en condiciones adecuadas para la hibridación de las sondas con los microorganismos pertenecientes a dichos géneros.

15 (b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra en donde los microorganismos pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* son aquellos marcados con al menos una sonda según las reivindicaciones 9 ó 10.

21. Método para la detección en una muestra de *Enterobacter aerogenes* Bac que comprende

20 (a) poner en contacto la muestra que se sospecha contiene *Enterobacter aerogenes* con al menos una sonda según las reivindicaciones 4 ó 5 y con al menos una sonda según las reivindicaciones 9 ó 10 en condiciones adecuadas para la hibridación de las sondas con los microorganismos pertenecientes a dichos géneros y

25 (b) detectar la fluorescencia emitida por las moléculas de oligonucleótido que han hibridado con la muestra en donde los microorganismos pertenecientes a la especie *Enterobacter aerogenes* Bac son aquellos marcados simultáneamente con al menos una sonda según las reivindicaciones 4 ó 5 y con al menos una sonda según las reivindicaciones 9 ó 10.

30 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 que comprende, adicionalmente, determinar la viabilidad celular.

23. Método según la reivindicación 22 en el que la viabilidad celular se determina usando un colorante de exclusión.

35 24. Método según la reivindicación 23 en el que el colorante de exclusión es yoduro de propidio.

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24 que comprende adicionalmente la determinación del número total de células.

40 26. Método según la reivindicación 25 en el que la determinación del número total de células en la muestra se efectúa mediante el uso de un compuesto seleccionado del grupo de

(a) un agente que proporciona una señal fluorescente en presencia de ADN de cadena doble y

45 (b) una sonda capaz de hibridar específicamente con el ADNr 16S de todos los organismos del superreino bacteria.

27. Método según la reivindicación 26 en el que el agente que proporciona una señal fluorescente en presencia de ADN de cadena doble es DAPI o SYTO13.

50 28. Método según la reivindicación 26 en el que la sonda capaz de hibridar específicamente con el ADNr 16S de todos los microorganismos comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28 en el que la muestra de bacterias se encuentra inmovilizada en un soporte.

55 30. Método según la reivindicación 29 en el que el soporte es una biopelícula.

31. Método según la reivindicación 29 en el que la muestra que contiene bacterias inmovilizadas se ha obtenido mediante la inmovilización de bacterias en suspensión.

60 32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 31 en el que la determinación de las células cuyo ADN hibrida con al menos uno de los oligonucleótidos y/o la determinación del número de células totales se determina mediante citometría de flujo o mediante hibridación fluorescente *in situ*.

65 33. Método para la caracterización de una población bacteriana que comprende

(a) poner en contacto dicha población bacteriana con un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y

## ES 2 330 820 B1

- (b) determinar el número de células cuyo ADN hibrida específicamente con dicho oligonucleótido y el número total de células en donde el porcentaje de células positivas cuyo ADN hibrida con el oligonucleótido con respecto al número de células totales indica el porcentaje de bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* en la muestra.

5

34. Método según la reivindicación 33 en el que la población bacteriana se pone en contacto en la etapa (a) adicionalmente con un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde el porcentaje de células positivas para dicho oligonucleótido con respecto al número de células totales indica el porcentaje de bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea*.

10

35. Método para la caracterización de una población bacteriana que comprende

- (a) poner en contacto dicha población bacteriana con un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 y

15

- (b) determinar el número de células cuyo ADN hibrida específicamente con dicho oligonucleótido sonda y el número total de células

20 en donde el porcentaje de células positivas cuyo ADN hibrida con el oligonucleótido con respecto al número de células totales indica el porcentaje de bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* en la muestra.

25 36. Método según la reivindicación 35 en el que la población bacteriana se pone en contacto en la etapa (a) adicionalmente con un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el porcentaje de células positivas para dicho oligonucleótido con respecto al número de células totales indica el porcentaje de bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*.

30

37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36 en el que la población bacteriana se pone en contacto en la etapa (a) adicionalmente con un oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de organismos de la familia *Enterobacteriaceae*.

38. Método según la reivindicación 37 en el que el oligonucleótido que hibrida específicamente con la región repetitiva intergénica consenso (ERIC) de organismos de la familia *Enterobacteriaceae* comprende la secuencia SEQ ID NO:6.

35

39. Método según la reivindicación 37 en el que oligonucleótido que hibrida específicamente con la región intergénica repetitiva consenso (ERIC) de organismos de la familia *Enterobacteriaceae* consiste en la secuencia SEQ ID NO:6.

40

40. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 39 en el que el oligonucleótido según las reivindicaciones 1 a 3 está marcado con un primer colorante fluorescente, el oligonucleótido según las reivindicaciones 4 a 6 está marcado con un segundo marcador fluorescente y el oligonucleótido que hibrida específicamente con la región intergénica repetitiva consenso (ERIC) de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* está marcado con un tercer marcador fluorescente.

45

41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40 en el que la determinación del número de células cuyo ADN hibrida con cada uno de los oligonucleótidos se lleva a cabo mediante hibridación fluorescente *in situ*.

50

42. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 41 en el que la determinación del número total de células en la muestra se efectúa mediante el uso de un compuesto seleccionado del grupo de

- (a) un agente que proporciona una señal fluorescente en presencia de ADN de cadena doble y

- (b) una sonda capaz de hibridar específicamente con el ADN 16S de todos los organismos del superreino bacteria.

55

43. Método según la reivindicación 42 en el que el agente que proporciona una señal fluorescente en presencia de ADN de cadena doble es DAPI o SYTO13.

60

44. Método según la reivindicación 42 en el que la sonda capaz de hibridar específicamente con el ADNr 16S de todos los microorganismos comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7.

45. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 41 en el que la determinación del número total de células se lleva a cabo mediante hibridación fluorescente *in situ* o mediante citometría de flujo.

65

46. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 45 en el que la muestra de bacterias se encuentra inmovilizada en un soporte.

47. Método según la reivindicación 46 en el que el soporte es una biopelícula.

## ES 2 330 820 B1

48. Método según la reivindicación 46 en el que la muestra que contiene bacterias inmovilizadas se ha obtenido mediante la inmovilización de bacterias en suspensión.

5 49. Método para determinar la eficacia de un tratamiento antibacteriano sobre las enterobacterias que forman una biopelícula que comprende las etapas de

(a) someter la biopelícula a un tratamiento antibacteriano

10 (b) poner en contacto dicha biopelícula con al menos una sonda según se define en las reivindicaciones 11 a 14 y

(c) determinar el porcentaje de células positivas para la sonda o sondas aplicada o aplicadas en la etapa (b) con respecto al número total de células

15 en donde una reducción del valor determinado en la etapa (c) con respecto al valor determinado en ausencia de tratamiento antibacteriano es indicativo de que el tratamiento es particularmente eficaz para eliminar las enterobacterias de la biopelícula.

20 50. Método según la reivindicación 49 en el que la determinación del número total de células en la muestra se efectúa mediante el uso de un agente que proporciona una señal fluorescente en presencia de ADN de cadena doble.

51. Método según la reivindicación 50 en el que el agente que proporciona una señal fluorescente en presencia de ADN de cadena doble es DAPI.

25 52. Método según la reivindicación 51 en el que la determinación del número total de células en la muestra se efectúa mediante el uso de una sonda capaz de hibridar específicamente con el ADN 16S de todos los organismos del superreino Bacteria.

30 53. Método según la reivindicación 52 en el que la sonda capaz de hibridar específicamente con el ADN 16S de todos los organismos del superreino bacteria contiene o comprende la secuencia SEQ ID NO:7.

54. Método según las reivindicaciones 49 a 53 en el que la determinación del número de células positivas para las sondas aplicadas en la etapa (b) y el número de células totales se determina mediante hibridación fluorescente *in situ*.

35

40

45

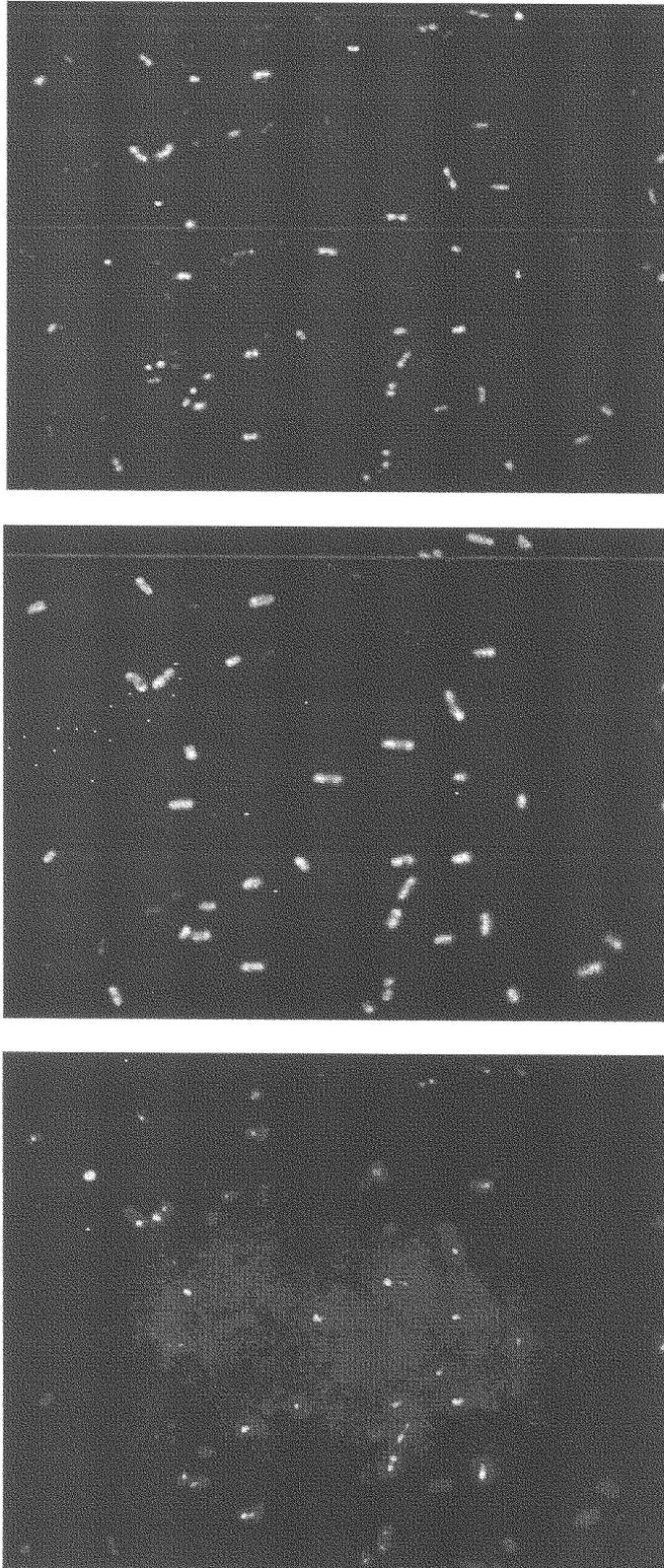
50

55

60

65

ES 2 330 820 B1



**FIGURA 1**

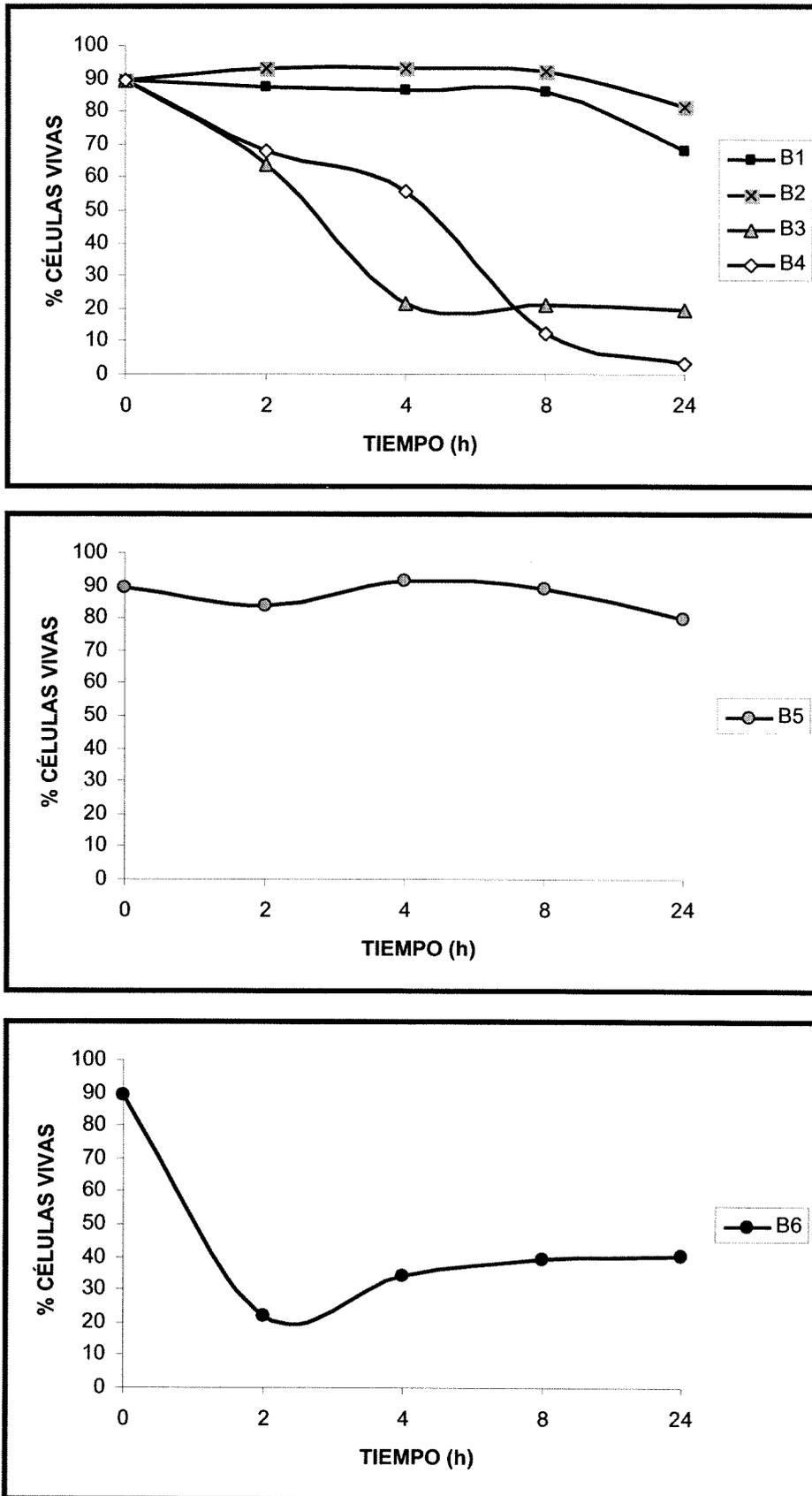


FIGURA 2 A

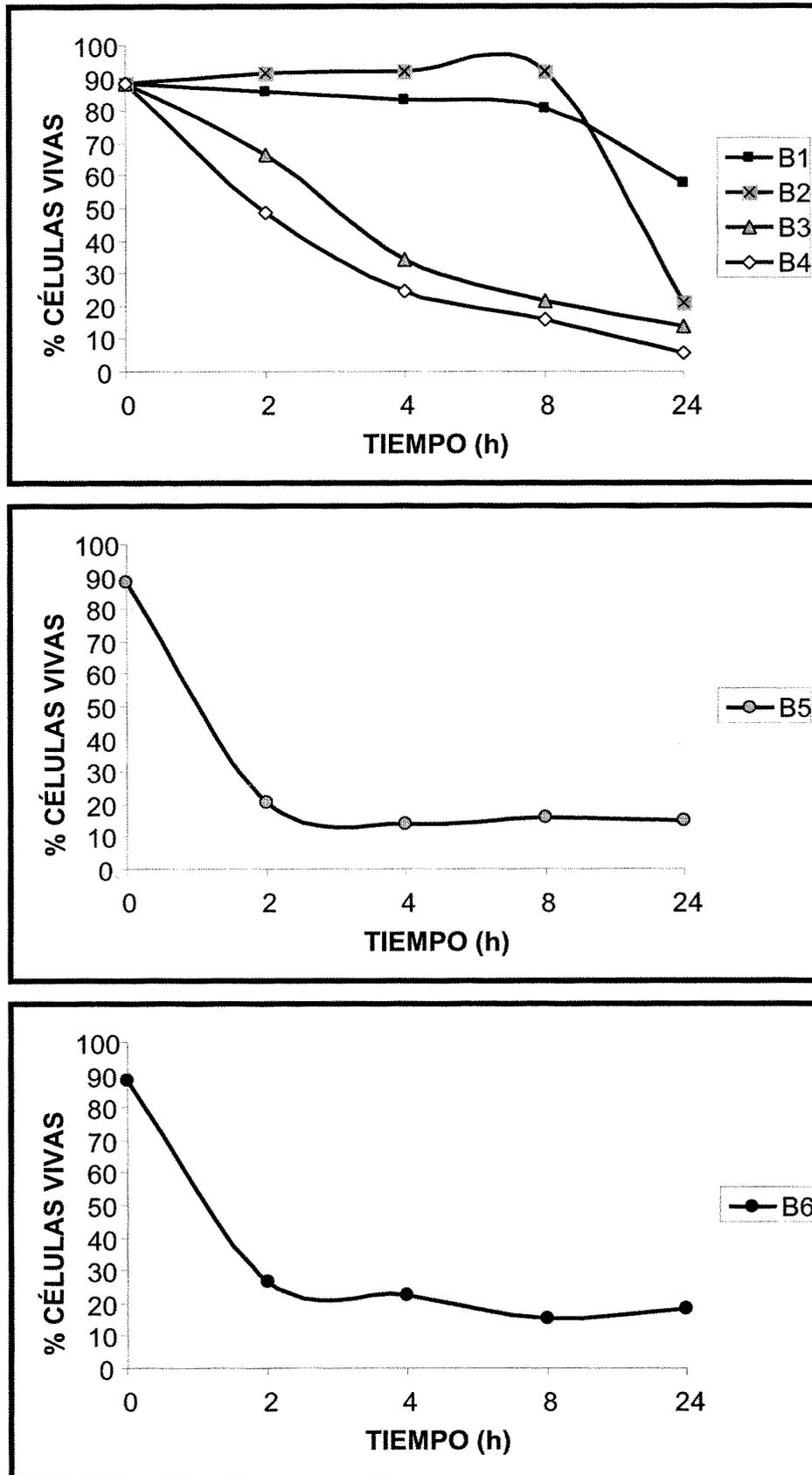


FIGURA 2 B

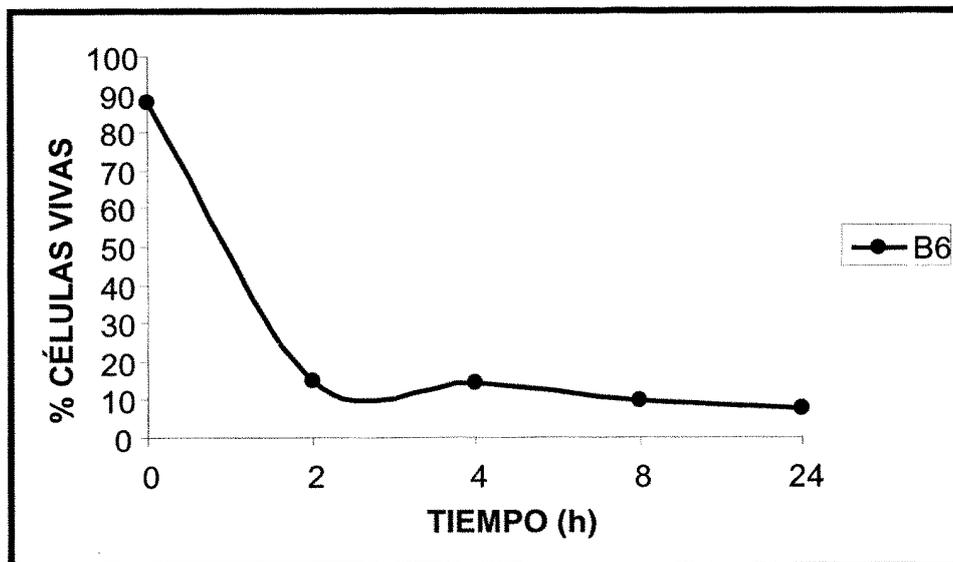
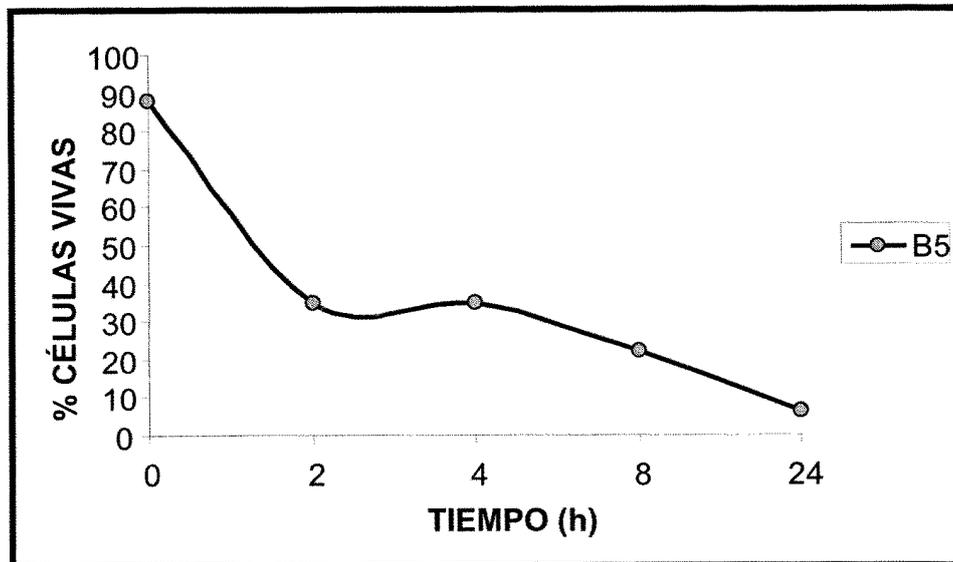
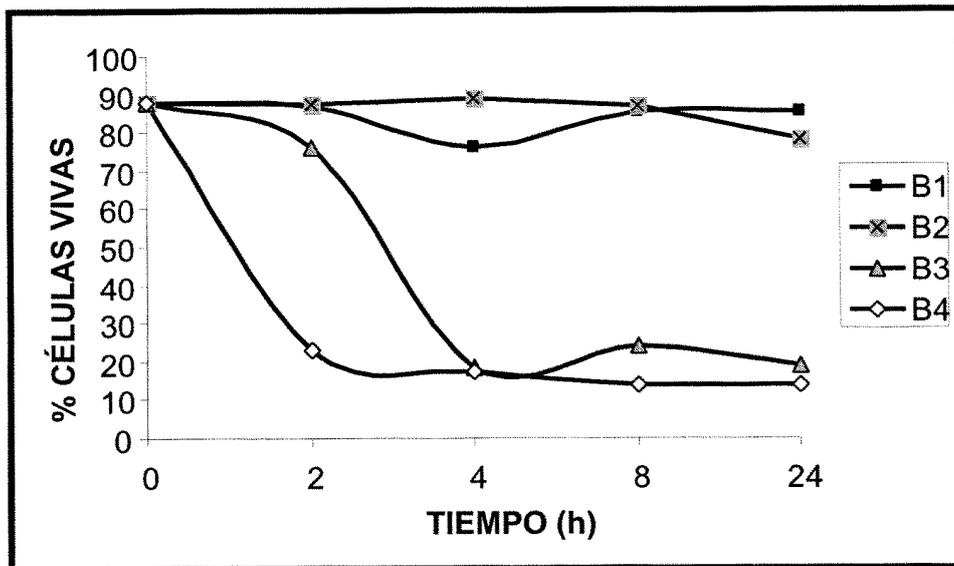


FIGURA 2 C

# ES 2 330 820 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

5 <120> MÉTODOS Y COMPUESTOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN BIOPELÍCULAS

10 <130> P3048ES00

<160> 8

15 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1436

20 <212> ADN

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 1

25 atcctggctc agattgaacg ctggcggcag gcctaacaca tgcaagtcga gcggtagcac 60  
agagagcttg ctctcgggtg acgagcggcg gacgggtgag taatgtctgg gaaactgcct 120  
gatggagggg gataactact ggaaacggta gctaataccg cataacgctg caagaccaa 180  
30 gtgggggacc ttcgggcctc atgccatcag atgtgccag atgggattag ctagtaggtg 240  
gggtaacggc tcacctaggc gacgatccct agctggctc agaggatgac cagccacact 300  
35 ggaactgaga cacgggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg 360  
gcgcaagcct gatgcagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg ccttcggggt gtaaagcact 420  
ttcagcgggg aggaaggcgt taaggttaat aaccttggcg attgacgta cccgcagaag 480  
40 aagcaccggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gagggtgcaa gcgttaatcg 540  
gaattactgg gcgtaaagcg cacgcaggcg gtctgtcaag tcggatgtga aatccccggg 600  
cttaacctgg gaactgcatt cgaaactggc aggctagagt cttgtagagg ggggtagaat 660  
45 tccaggtgta gcggtgaaat gcgtagagat ctggaggaat accggtggcg aaggcggccc 720  
cctggacaaa gactgacgct caggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780  
tggtagtcca cgccgtaaac gatgtcgatt tggaggttgt gcccttgagg cgtggcttcc 840  
50 ggagctaacg cgttaagtcg accgcctggg gagtacggcc gcaaggtaa aactcaaatg 900  
aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggttt aattcgatgc aacgcgaaga 960  
55 accttaccta ctcttgacat ccagagaact tagcagagat gctttggtgc cttcgggaac 1020  
tgtgagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgaatggtg ggtaagtcc 1080  
cgcaacgagc gcaaccctta tcctttgttg ccagcggctc ggccgggaac tcaaaggaga 1140  
60 ctgccagtga taaactggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcacatgag cccttacgac 1200  
cagggtaca cacgtgctac aatggcatat acaaagagaa gcgacctcgc gagagcaagc 1260  
ggacctcata aagtatgtcg tagtccggat tggagtctgc aactcgactc catgaagtcg 1320  
65 gaatcgctag taatcgtaga tcagaatgct acggtgaata cgttcccggg ccttgtagac 1380  
accgcccgtc acaccatggg agtgggttgc aaaagaagta ggtagcttaa ccttcg 1436

## ES 2 330 820 B1

<210> 2

<211> 1436

<212> ADN

5 <213> *Raoultella planticola*

<400> 2

```

10      atcctggctc agattgaacg ctggcggcag gcctaacaca tgcaagtcga gcggtagcac      60
      agagagcttg ctctcgggtg acgagcggcg gacgggtgag taatgtctgg gaaactgcct      120
      gatggagggg gataactact ggaaacggta gctaataccg cataacgtcg caagacccaaa      180
15      gtgggggacc ttcgggectc atgccatcag atgtgcccag atgggattag ctagtaggtg      240
      ggtaaatggc tcacctaggg gacgatccct agctggctctg agaggatgac cagccacact      300
20      ggaactgaga cacggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg      360
      gcgcaagcct gatgcagcca tgcccgctgt atgaagaagg ccttcggggtt gtaaagtact      420
      ttcagcgagg aggaaggcgt taaggttaat aaccttagcg attgacgtta ctgcgagaag      480
25      aagcaccggc taactccgtg ccagcagccg cgtaatacag gagggtgcaa gcgttaatcg      540
      gaattactgg gcgtaaagcg cacgcaggcg gttgttaag tcagatgtga aatccccggg      600
30      ctcaacctgg gaactgcatt taaaactggc aagcttgagt cttgtagagg ggggtagaat      660
      tccaggtgta gcggtgaaat gcgtagagat ctggaggaat accggtggcg aaggcggccc      720
      cctggacaaa gactgacgct caggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc      780
35      tggtagtcca cgctgtaaac gatgtcgact tggaggttgt tcccttgagg agtggcttcc      840
      ggagctaacg cgtaagtcg accgcctggg gagtacggcc gcaaggttaa aactcaaatg      900
40      aattgacggg ggccccacac agcggtgagg catgtggttt aattcgatgc aacgcgaaga      960
      accttaccta ctcttgacat ccagagaact tagcagagat gctttggtgc cttcgggaac      1020
      tctgagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgaatggtg ggtaagtcc      1080
45      cgcaacgagc gcaaccctta tcctttggtg ccagcgggcc gcccggaac tcaaaggaga      1140
      ctgccagtga taaactggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcacatgg cccttacgag      1200
50      tagggctaca cacgtgctac aatggcatat acaaagagaa gcgacctcgc gagagcaagc      1260
      ggacctcata aagtatgtcg tagtccggat tggagtctgc aactcgactc catgaagtcg      1320
55      gaatcgctag taatcgtaga tcagaatgct acggtgaata cgttcccggg ccttgtacac      1380
      accgcccgtc acaccatggg agtgggttgc aaaagaagta ggtagcttaa ccttcg      1436

```

60 <210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> Secuencia de la sonda KPN-1

## ES 2 330 820 B1

<400> 3

aaggcgtaa ggtaataa

19

5

<210> 4

<211> 1511

<212> ADN

10 <213> *Enterobacter cloacae*

<400> 4

15	tgaacgctgg cggcaggcc aacacatgca agtcgaacgg tagcacagag agcttgctct	60
	cgggtgacga gtggcggacg ggtgagtaal gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata	120
	actactggaa acgqtagcta ataccgcata aygtcgcaag accaaagagg gggaccttcg	180
20	ggcctcttgc catcagatgt gccagatgg gattagctag taggtgggt aacggctcac	240
	ctaggcgacg atccctagct ggtctgagag gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg	300
	gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatgggagc aagcctgatg	360
25	cagccatgcc gcgtgtatga agaaggcctt cgggltgtaa agtacttca cggggagga	420
	aggtgtttg gtttaataacc gcagcaattg acgttaccog cagaagaagc accggctaac	480
30	tccgtgccag cagcccggt aatacggagg gtgcaagcgt taatcggaat tactggcgt	540
	aaagcgcacg caggcggctt gtcaagtcgg atgtgaaatc cccgggctca acctgggaac	600
	tgcattcgaa actggcaggc tggagtcttg tagagggggg tagaattcca ggtgtagcgg	660
35	tgaaatgcgt agagatctgg aggaataacc gtggcgaagg cggccccctg gacaaagact	720
	gacgctcagg tgcgaaaagc tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc	780
40	gtaaacgatg tgcatttga ggttgtgcc ttgaggcgtg gcttccggag ctaacgcgtt	840
	aatcgaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact caaatgaatt gacgggggcc	900
	cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg cgaagaacct tacctggtct	960
45	tgacatccac agaactttcc agagatggat tggtagccttc gggaaacttg agacaggtgc	1020
	tgcattgctg tgcctagctc gtgttglgaa atgltgggtt aagtcocgca acgagcgcaa	1080
50	cccttatcct ttgttgcag cggctcggcc gggaaactcaa aggagactgc cagtgataaa	1140
	ctggaggaag gtgggatga cgtcaagtca tcatggcctt tacgaccagg gctacacacg	1200
	tgctacaatg gcgcatacaa agagaagcga cctcgcgaga gcaagcggac ctcataaagt	1260
55	gcgtcgtagt ccggattgga gtctgcaact cgactccaig aagtcggaat cgctagtaat	1320
	cgtagatcag aatgctacgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac	1380
60	catgggagtg ggttgcaaaa gaagtaggta gcttaacctt cgggagggcg cttaccactt	1440
	tgtgatcat gactgggtg aagtcgtaac aaggtaaccc taggggaacc tgcggctgga	1500
	tcacctcctt g	1511

65

<210> 5

<211> 16

## ES 2 330 820 B1

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia de la sonda ENT-1	
	<400> 5	
10	cagcaattga cgttac	16
	<210> 6	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia de la sonda ERIC-1	
	<400> 6	
25	atgtaagctc ctggggatc ac	22
	<210> 7	
30	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia de la sonda EUB338	
	<400> 7	
40	gctgctccc gtaggagt	18
	<210> 8	
45	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia de la sonda Kpn	
	<400> 8	
55	cctacacacc agcgtgcc	18
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 330 820

② Nº de solicitud: 200703105

③ Fecha de presentación de la solicitud: **23.11.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	ES 2152933 T3 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 17.08.1994	11-16 49-54
Y A	WO 2005042778 A1 (ACOLYTE BIOMEDICAL LTD) 12.05.2005	49-54 1-48
Y A	WO 03035905 A1 (UNIV AIX-MARSEILLE II) 01.05.2003	49-54 1-48
A	WO 9950458 A2 (US CENTERSDISEASE & PREVENTION) 07.10.1999	1-54
A	ES 2206551 T3 (BIO MERIEUX) 16.05.2004	1-54

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**  
27.11.2009

**Examinador**  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BASES DE SECUENCIAS DE EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-19	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-19	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2152933 T3	17.08.1994
D02	WO 2005042778 A1	12.05.2005
D03	WO 03035905 A1	01.05.2003
D04	WO 9950458 A2	07.10.1999
D05	ES 2206551 T3	16.05.2004

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

El documento D01 describe la sonda denominada ERIC1R (correspondiente a SEQ ID N° 38) que presenta un 100% de homología con la sonda ERIC-1 correspondiente a SEQ ID N° 6 de la presente solicitud. La sonda descrita en D01 se utiliza para la identificación de enterobacterias. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 11-16 no se consideran nuevas ni inventivas.

Por su parte los documentos D02 y D03 describen sendos métodos para evaluar la capacidad antimicrobiana de diferentes compuestos. En D02 el método se basa en ensayos de hibridación y en D03 se miden cantidades de DNA bacteriano y se comparan el número de copias en cultivos tratados o no tratados. A la luz del estado de la técnica establecido por D01 y D02/D03 y teniendo en cuenta que tanto la sonda ERIC1 como la sonda EUB388 son conocidas esta Oficina considera que las reivindicaciones 48-54 carecen de actividad inventiva.

En opinión de esta Oficina las reivindicaciones 1-10 y 17-48 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva. Los documentos D04 y D05 describen sondas específicas de enterobacterias y su uso en la identificación de las mismas en muestras de distinto origen. Estos documentos forman parte del estado general de la técnica relativo a la presente solicitud y no se consideran relevantes con respecto a la novedad y actividad inventiva de las sondas y métodos definidos en las reivindicaciones 1-10 y 17-48.